บทที่ 1 บัฟเฟอร์

1. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมขึ้นจากคู่สารต่อไปนี้ จงขีด ✓ ลงในช่อง เพื่อบอกว่าสารใดมีบทบาทเป็น proton donor และสารใดเป็น proton acceptor

	คู่สารคู่ที่ 1		คู่สารคู่ที่ 2		คู่สารคู่ที่ 3	
	H_3PO_4	NaH_2PO_4	Na_2CO_3	$NaHCO_3$	HCOONa	HCOOH
Proton donor	✓			✓		✓
Proton acceptor		✓	✓		✓	

แนวการตอบ สารที่เป็น proton donor จะมี H มากกว่าอีกตัว

2. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจาก H_2NCH_2COOH โดยใช้ค่า pK_{a2} = 9.78 จะมี proton donor และ proton acceptor เป็นสารใด

ตอบ ที่ pK_{a2} glycine จะมีสมการการแตกตัวคือ $^+H_3NCH_2COO^- \longrightarrow H^+ + H_2NCH_2COO^-$

ดังนั้น proton donor คือ $^+H_3NCH_2COO^-$ ส่วน proton acceptor คือ $H_2NCH_2COO^-$

3. ในการเตรียมบัฟเฟอร์ 0.25 โมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 100 มิลลิลิตร จะต้องใช้

ก. 0.25 M NaH_2PO_4 , 0.25 M K_2HPO_4 และน้ำกลั่น อย่างละกี่มิลลิลิตร

จากสมการ Henderson-Hassenbalch pH = pKa + log([A^-]/[HA])

แทนค่าได้ 7.0 = 6.8 + log([A^-]/[HA]) ดังนั้น log([A^-]/[HA]) = 0.2 และ [A^-]/[HA] = 1.58

แต่ [buffer] = [A^-] + [HA] = 0.25 M

ดังนั้น 1.58[HA] + [HA] = 0.25 M และ [HA] = 0.097 M , [A^-] = 0.153 M

พิจารณา 0.25 M NaH_2PO_4 ซึ่งทำหน้าที่เป็น HA จะต้องใช้ปริมาตร = (0.097/0.25) x 100 = 38.8 ml

และต้องใช้ 0.25 M K_2HPO_4 ซึ่งทำหน้าที่เป็น A^- ปริมาตร = (0.153/0.25) x 100 = 61.2 ml

ผสมกันจะได้ 100 ml พอดี ไม่ต้องเติมน้ำกลั่น

ข. 0.5 M NaH_2PO_4 , 0.5 M NaOH และน้ำกลั่นอย่างละกี่มิลลิลิตร

ในกรณีนี้ องค์ประกอบที่ยังขาดอยู่คือ Na_2HPO_4 จะเกิดขึ้นได้ดังสมการ

$NaH_2PO_4 + NaOH \longrightarrow Na_2HPO_4 + H_2O$

จากข้อ ก. ต้องการ Na_2HPO_4 เข้มข้น 0.153 M

ดังนั้นต้องใช้ 0.5 M NaOH ปริมาตร = 0.153/0.5 x 100 = 30.6 ml

และต้องใช้ 0.5 M NaH_2PO_4 ปริมาตร = 0.25/0.5 x 100 = 50 ml ---------- (0.25 M มาจาก 0.097 M + 0.153 M เพราะส่วนหนึ่งทำหน้าที่เป็น HA และอีกส่วนทำหน้าที่เกิดปฏิกิริยากับ NaOH กลายเป็น A^-)

เติมน้ำกลั่นอีก 100-(30.6+50) = 19.4 ml

4. เมื่อนำ 10 มิลลิลิตร 0.5 M CH_3COOH ผสมกับ 10 มิลลิลิตร 0.2 M CH_3COONa สารละลายที่ได้จะมีพีเอชเท่าใด (กำหนด pK_a = 4.76) และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเท่าใด

ปริมาตรรวมหลังผสมรวมกัน เท่ากับ 10+10 = 20 มิลลิลิตร

หลังผสมรวมกันแล้ว ความเข้มข้นของ CH_3COOH จะเป็น 0.25 โมลาร์

หลังผสมรวมกันแล้ว ความเข้มข้นของ CH_3COONa จะเป็น 0.1 โมลาร์

แทนค่าลงในสมการ Henderson-Hasselbalch

$pH = pK_a + \log([A^-]/[HA])$

$pH = 4.76 + \log(0.1/0.25) = 4.36$

และความเข้มข้น = 0.25 + 0.1 = 0.35 โมลาร์

5. การผสมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตทเข้าด้วยกัน จะได้สารละลายบัฟเฟอร์หรือไม่ ถ้าได้จะมีความแตกต่างจากการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตท และการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อย่างไรบ้าง จงอธิบาย

สมการเคมีของการผสมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตท เป็นดังนี้

$HCl + CH_3COONa \longrightarrow CH_3COOH + NaCl$ องค์ประกอบไม่ครบ ไม่ได้สารละลายบัฟเฟอร์ ขาด A^-

สมการเคมีของการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตท เป็นดังนี้

$CH_3COOH + CH_3COONa \longrightarrow CH_3COONa + CH_3COOH$ ได้องค์ประกอบครบเป็นสารละลายบัฟเฟอร์

สมการเคมีของการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นดังนี้

$CH_3COOH + NaOH \longrightarrow CH_3COONa + H_2O$ องค์ประกอบไม่ครบ ไม่ได้สารละลายบัฟเฟอร์ ขาด HA

เมื่อพิจารณาทั้งสามสมการเคมี ความแตกต่างอยู่ที่องค์ประกอบที่เกิดขึ้นด้านขวามือของสมการ ต้องมีครบทั้งกรดอ่อน (HA) และเกลือของกรดอ่อน (A^-) จึงจะได้สารละลายบัฟเฟอร์

หมายเหตุ กรณีที่ผสม HCl ลงใน CH_3COONa หรือกรณีที่ผสม NaOH ลงใน CH_3COOH โดยจำนวนโมลของ HCl หรือ NaOH น้อยกว่า CH_3COONa หรือ CH_3COOH ตามลำดับ แบบนี้ก็จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ เพราะมีสารเหลือจากปฏิกิริยาอยู่

บทที่ 2 สเปกโตรโฟโตเมตรี

1. นำเนย 10 กรัม มาทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน แล้วสกัดเอา non-saponification fraction มาละลายในคลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร ค่าการดูดแสงที่วัดได้โดยใช้คิวเวตขนาด 1 เซนติเมตร เป็น 0.55 ที่ 328 นาโนเมตรและ 0.48 ที่ 458 นาโนเมตร **จงคำนวณหาปริมาณแคโรทีนและวิตามินเอที่มีอยู่ในเนย** โดยกำหนดค่า extinction coefficient ของแคโรทีนและวิตามินเอที่ความยาวคลื่นทั้งสองไว้ในตารางข้างล่างนี้

สารประกอบ	$E1\%_{1cm}$ ในคลอโรฟอร์ม	
	328 นาโนเมตร	458 นาโนเมตร
แคโรทีน	340	2200
วิตามินเอ	1550	~0

แนวทางการหาคำตอบ นิสิตต้องตอบให้ได้ก่อนว่าสารทั้งสองต่างรบกวนการวิเคราะห์ซึ่งกันและกันหรือไม่ และถ้ารบกวนการวิเคราะห์ซึ่งกันและกันจริง การรบกวนนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อมีการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นใด

ในกรณีที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้น สารทั้งสองต่างรบกวนซึ่งกันและกัน นี่หมายความว่าที่ความยาวคลื่นนี้ สารทั้งคู่ต่างวัดค่าการดูดแสงได้ ดังนั้นค่าการดูดแสงที่วัดได้คือค่าการดูดแสงของสารแต่ละชนิดรวมกัน ซึ่งการหาปริมาณสารชนิดใดจากค่าการดูดแสงด้วยการคำนวณโดยใช้กฎของเบียร์ จึงต้องหักค่าการดูดแสงของสารอีกตัวที่รบกวนการวิเคราะห์ออกก่อน

วิธีทำ ค่า $E1\%_{1cm}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารดูดกลืนแสงเป็น 1 กรัมเปอร์เซ็นต์ และความยาวของระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็น 1 เซนติเมตร

จากกฎของเบียร์ A = abc เมื่อ a = $E1\%_{1cm}$, b = ระยะทางที่แสงส่องผ่าน = 1 cm และ c = ความเข้มข้นของสาร

จากตาราง จะเห็นว่าที่ความยาวคลื่น 458 นาโนเมตร ไม่มีการดูดกลืนแสงของวิตามินเอรบกวน

ดังนั้น หาปริมาณแคโรทีนได้จาก c = A/(ab) = 0.48/(2200 x 1) = 2.18×10^{-4} กรัม/100 มิลลิลิตร

ส่วนที่ความยาวคลื่น 328 นาโนเมตร แคโรทีนก็สามารถดูดกลืนแสงได้

หาปริมาณวิตามินเอผสมแคโรทีนได้จาก c = A/(ab) = 0.55/(1550 x 1) = 3.55×10^{-4} กรัม/100 มิลลิลิตร

ดังนั้น วิตามินเอมีปริมาณ = 0.55/(1550 x 1) - 0.48/(2200 x 1) = 1.37×10^{-4} กรัม/100 มิลลิลิตร

2. สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่าง U.... สี ..... ที่กลุ่มนิสิตได้มา นิสิตคิดว่าจะสามารถหาความเข้มข้นของแต่ละแม่สีที่ผสมอยู่ได้ถูกต้องหรือไม่ แนวการตอบ ให้ดูแนวทางจากคำถามข้อ 1.

วิธีทำ ต้องดูจากการพล็อตกราฟ spectrum ว่ามีการผสมกันของแม่สีแต่ละสีที่ λ_{max} ทั้งสองหรือไม่ ถ้ามีการผสมกันก็จะไม่สามารถหาความเข้มข้นของแต่ละแม่สีได้ถูกต้อง

3. จงให้เหตุผลมา เพราะเหตุใดการหาความเข้มข้นของสารจึงต้องวัดค่าการดูดแสงที่ λ_{max} ของสารนั้น

ตอบ ที่ λ_{max} สารนั้น ๆ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด ทำให้มีความไวในการวัดสูงที่สุด ได้ค่าที่น่าเชื่อถือ ลดการรบกวนจากการดูดกลืนแสงของสารอื่น ๆ ที่อาจปนอยู่

บทที่ 3 คาร์โบไฮเดรต

ตัวอย่างไกลโคเจนที่สกัดได้จาก *E.coli* ปริมาณ 25 มิลลิกรัม ถูกนำมาไฮโดรไลซ์ด้วย 2 มิลลิลิตรของกรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์ แล้วทำให้เป็นกลางและเจือจางให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสพบว่ามีความเข้มข้น 2.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณไกลโคเจนที่มีอยู่จริงในตัวอย่างที่สกัดได้นี้เป็นเท่าใด

แนวทางการคิดต่อไป ต้องพิจารณาถึงปฏิกิริยาการเชื่อมโยงโมเลกุลของกลูโคสเป็นไกลโคเจน ซึ่งจะมีพันธะไกลโคซิดิกเกิดขึ้น นั้นเป็นอย่างไร ก็จะทราบน้ำหนักไกลโคเจนจริงที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น

วิธีทำ

น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส = 180 (มี 6.02×10^{23} โมเลกุลต่อ 180 กรัม)

ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ใน 10 มิลลิลิตร คิดได้เป็นโมเลกุลกลูโคสทั้งสิ้น $= 23.5 \times 10^{-3} \times (6.02 \times 10^{23}) /180 = 7.86 \times 10^{19}$ โมเลกุล

(คำนวณจาก กลูโคส 1 โมลาร์ หมายถึง มีกลูโคส 180 กรัม/ลิตร (180 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ดังนั้น 2.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากผลการวิเคราะห์ แสดงว่าใน 10 มิลลิลิตรมีกลูโคส 10x2.35 = 23.5 มิลลิกรัม)

แต่เนื่องจากในการเกิดไกลโคเจนนั้น เมื่อกลูโคส 2 โมเลกุลมาต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก จะมีน้ำหลุดออกไป 1 โมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลของน้ำ = 18

ดังนั้น น้ำหนักที่แท้จริงของไกลโคเจนที่มีอยู่ในตัวอย่างคือ ประมาณ (180-18)/180 หรือประมาณ 90% ของน้ำหนักกลูโคสหลังไฮโดรไลส์ หรือประมาณ 23.5x0.9 = 21.15 มิลลิกรัม

บทที่ 4 กรดอะมิโนและโปรตีน 1

1. จากการทดสอบต่าง ๆ เจลาตินมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acids) เป็นอย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับแอลบูมินไข่ขาว

ตอบ เจลาตินมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น น้อยกว่าแอลบูมินไข่ขาว สังเกตได้จากการทดสอบ xanthoproteic และ Hopkins-Cole's ให้ผลลบ แสดงว่าขาดกรดอะมิโนชนิด aromatic

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเจลาตินด้วยวิธีวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรกระทำได้หรือไม่ จงให้เหตุผล

ตอบ ไม่ได้ เพราะที่ 280 นาโนเมตรเป็นค่าการดูดกลืนแสงของวงแหวน aromatic แต่เจลาตินขาดกรดอะมิโนชนิด aromatic

3. จงเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนวิธีต่าง ๆ ในหัวข้อต่อไปนี้

ก. ความไวของวิธีวิเคราะห์

วิธีแบรดฟอร์ดไวกว่าวิธีไบยูเร็ต

ข. สภาพธรรมชาติของโปรตีนหลังการวิเคราะห์

วิธี Biuret โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจาก Cu^{2+} เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอะตอมไนโตรเจนที่พันธะ peptide ในสภาวะด่าง

วิธี Bradford โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติเช่นกัน เนื่องจากทำในสภาวะที่เป็นกรด

ค.ข้อจำกัดของการวิเคราะห์

วิธี Biuret อาจมีสารรบกวนปฏิกิริยาได้ เช่น แอมโมเนียมไอออน น้ำตาลรีดิวซิ่ง

วิธี Bradford อาจมีความไม่แน่นอนจากสัดส่วนของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เช่น อาร์จินีน ที่มีไม่เท่ากันในโปรตีนแต่ละชนิด

ง. ความสะดวกของการวิเคราะห์

วิธี Biuret มีความไวต่ำ เหมาะสำหรับโปรตีนเข้มข้นสูงเท่านั้น และเสียเวลาตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีก่อนวัดค่าการดูดแสง

วิธี Bradford มีความไวสูง สะดวกกว่า Biuret แต่มีสีติดข้างหลอดคิวเวต ต้องล้างทำความสะอาดทุกครั้ง